

代替の分離モードとして BioAccord システムで HILIC を用いたオリゴヌクレオチドのインタクト質量確認

Catalin E. Doneanu, Ying Qing Yu, Joseph Fredette, William J. Warren, Weibin Chen

Waters Corporation

要約

HILIC クロマトグラフィーは、オリゴヌクレオチドのインタクト質量確認のための自動化ワークフローに簡単に組み込むことができる、クリーンでコスト効率の高い分離法を提供します。この研究で示されているように、BioAccord LCMS システムにより、waters_connect ユーザーは、小サイズおよび中サイズのオリゴヌクレオチド（最大 50 mer）のインタクト質量を迅速かつ正確に確認できるようになります。

アプリケーションのメリット

- HILIC LC-MS で分析したオリゴヌクレオチドのインタクト質量確認について、良好な質量精度（15 ppm 未満）が得られる、コンプライアンス対応の自動化 HILIC LC-MS ワークフロー
- オリゴヌクレオチドの HILIC 分離には、移動相に関して、従来のイオン対逆相（IP-RP）分離と比較して、1) 移動相のコストが 10 倍以上低減、2) 毒性が大幅に軽減、3) LC-MS における移動相の安定性が 10 倍以上向上（最長 2 週間）、という 3 つの主な利点が見られる
- MaxPeak High Performance Surfaces を備えた ACQUITY Premier BEH Amide カラムは、ステンレス製ハードウェアの従来の ACQUITY BEH Amide カラムと比較して、カラムの不動態化が不要ですぐに使用できるため時間が節約可能に

はじめに

近年、低分子医薬品およびタンパク質医薬品の有力な代替品として、オリゴヌクレオチド医薬品が注目を集めています^{1,2}。オリゴヌクレオチド医薬品の製造および品質管理には、非常に選択性および感度の高い LC-MS 分析法が求められます。オリゴヌクレオチド分析における質量分析ベースの分析法として広く受け入れられているものの 1 つとして、イオン対逆相クロマトグラフィー (IP-RP) によるオリゴヌクレオチドの分離およびネガティブ ESI-MS モードでの MS による検出があります。オリゴヌクレオチド分析にこの分析法を使用して、waters_connect で制御する BioAccord システムを用いて、コンプライアンス対応のデータ取り込み、解析、およびレポート作成を行う自動ワークフローが最近報告されました^{3,4}。図 1 に示す BioAccord LC-MS システムは、バイオ医薬品ルーチン分析のための、小型で頑健性が高く、使いやすいプラットフォームとして 2019 年に発表されたものです。ここで使用している完全統合型の BioAccord LC-MS システムは、図 1 に示すように、ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム、可変 UV (TUV) 検出器、および ESI-Tof ACQUITY RDa 質量検出器で構成されています。



図 1. BioAccord LC-MS システム

ここでは、オリゴヌクレオチドのインタクト質量確認に関して、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）を IP-RP の代替の分離手法として使用する BioAccord LC-MS システムの機能について調査しました。最近発表された 2 件の文献^{5,6} によれば、HILIC は、IP-RP クロマトグラフィーほど普及していないものの、オリゴヌクレオチド分析に独自の機能を提供できることが示されています。HILIC の移動相には、イオン対試薬や毒性がある高価な揮発性修飾剤（1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノール（HFIP）など）を使用しません。この点は、この代替分離手法の採用に際して重要な検討事項と考えられます⁷。本アプリケーションノートに記載している LC-MS データは、オリゴヌクレオチド polyT 標準品（OST）、修飾オリゴヌクレオチド（完全にホスホロチオエート化された 25 mer オリゴヌクレオチド）、より大きい 57 mer オリゴヌクレオチドの 3 種類の化合物について取り込まれたものです。すべてのデータセットは、フルスキャン MS モードで取り込み、BayesSpray 質量スペクトルチャージデコンボリューションアルゴリズムを使用して waters_connect で解析し、各化合物について正確なインタクト質量測定値を得ました。

実験方法

試薬およびサンプル前処理

酢酸アンモニウム試薬（LiChropur、カタログ番号 5.33004.0050）は Millipore Sigma（米国ミズーリ州セントルイス）から購入しました。アセトニトリル（LC-MS グレード、カタログ番号 34881-1L）は Honeywell（米国ノースカロライナ州シャーロット）から入手しました。HPLC グレードの脱イオン（DI）水は、MilliQ システム（Millipore、米国マサチューセッツ州ベッドフォード）を使用して精製しました。MassPREP OST（オリゴヌクレオチド分離テクノロジー）標準品（Waters 製品番号： 186004135 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186004135-massprep-oligonucleotide-standard.html>>）を溶媒 A（10 mM 酢酸アンモニウム 75 % アセトニトリル溶液）に溶解して濃度 10 μ M の溶液を調製しました。25 mer の完全ホスホロチオエート化オリゴヌクレオチド（配列 5' -C*T*C*T*C*G*C*A*C*C*A*T*C*T*C*T*C*T*T*C*T*-3' の 25 mer PS オリゴ）および配列 5' -CAA TAT TTT ACA TGA ACT GGA GGT CCG TCA ATG ACA GTG TAG GCT GGA GCT GCT TCG-3' の 57 mer オリゴヌクレオチドはいずれも Integrated DNA Technologies（米国アイオワ州コーラルビル）から購入しました。いずれのオリゴも、10 μ m の濃度になるように溶媒 A（10 mM 酢酸アンモニウム 75% アセトニトリル溶液）に溶解しました。注入量は、すべてのオリゴサンプルについて 2 μ L でした。

LC-MS システム

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム、TUV 検出器、ACQUITY RDa 検出器を組み込んだ BioAccord システム

LC 条件

カラム：	ACQUITY Premier BEH Amide 1.7 μ m、130 Å、2.1 × 50 mm、製品番号 186009504
カラム温度：	60 °C
流速：	300 μ L/分
移動相：	溶媒 A: 10 mM 酢酸アンモニウム、75% アセトニトリル含有脱イオン水 溶剤 B: 10 mM 酢酸アンモニウム、25% アセトニトリル含有脱イオン水

サンプル温度： 6 °C

サンプルバイアル： QuanRecovery MaxPeak バイアル（製品番号
： 186009186）

注入量： 1 µL

グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	溶媒 A の組成 (%)	溶媒 B の組成 (%)	曲線 プロファイル
0.00	0.3	100	0	初期条件
1.00	0.3	100	0	
16.00	0.3	50	50	6
20.00	0.3	50	50	6
21.00	0.3	50	90	6
22.00	0.3	10	90	6
23.00	0.3	100	0	6
30.00	0.3	100	0	6

洗浄溶媒

パージ溶媒： 10 mM 酢酸アンモニウム、25% アセトニトリル含有
脱イオン水

サンプルマネージャー洗浄溶媒： 10 mM 酢酸アンモニウム、25% アセトニトリル

シール洗浄溶媒： 20% アセトニトリル含有脱イオン水

MS 条件

イオン化モード:	ESI-
キャピラリー電圧:	0.8 kV
コーン電圧:	40 V
イオン源温度:	120 °C
脱溶媒温度:	400 °C
脱溶媒ガス (N ₂) 圧力:	6.5 bar
Tof 質量範囲:	400 ~ 5000
取り込み速度:	2 Hz
ロックマス:	waters_connect ロックマス溶液 (製品番号 : 186009298)
データ取り込みソフトウェア:	waters_connect
データ解析ソフトウェア:	waters_connect

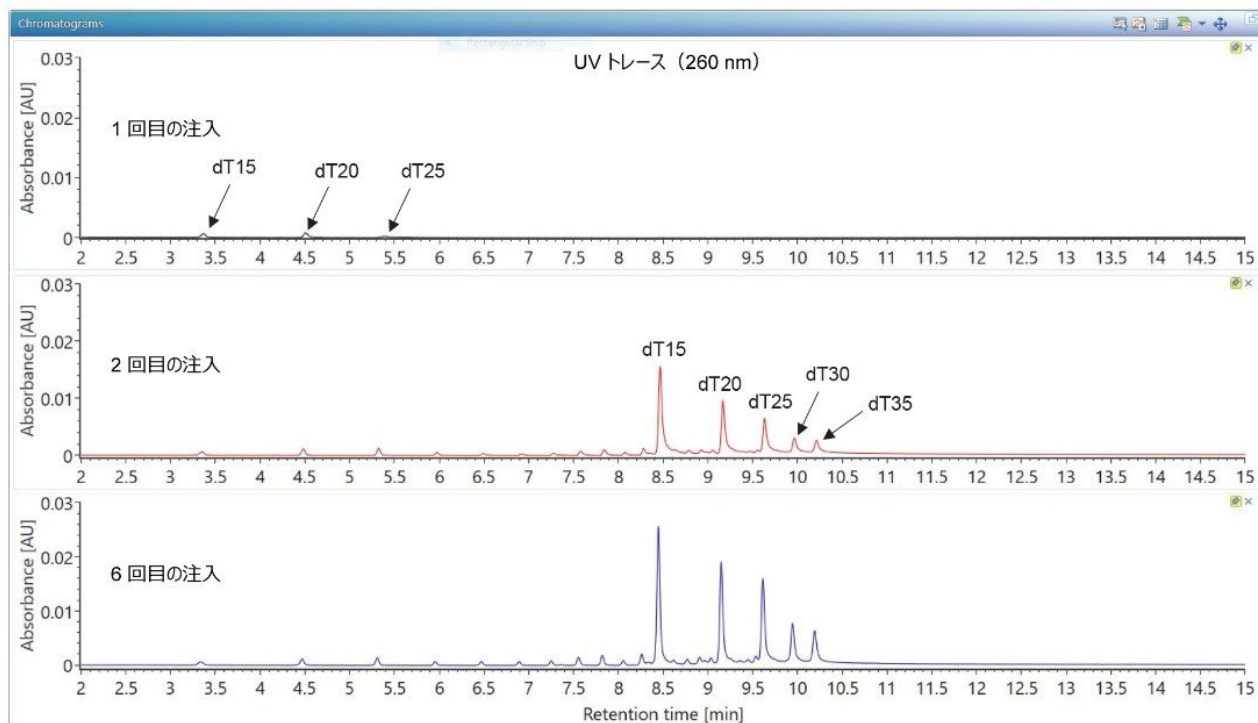
結果および考察

Waters MassPREP オリゴヌクレオチド標準混合物 (OST 標準品) の HILIC 分離を、通常の ACQUITY UPLC BEH Amide カラム (製品番号: 186004800 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186004800-acquity-uplc-beh-amide-column-130a-17--m-21-mm-x-50-mm-1-pk.html>>) および最近発表された ACQUITY Premier BEH Amide カラム (製品番号: 186009504 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186009504-acquity-premier-beh-amide--column-17--m-21-mm-x-50-mm-1-pk.html>>) で実施しました。この最新のカラムは、MaxPeak High Performance

Surfaces (HPS) テクノロジーを採用した、2 μm 以下の粒子を充填したカラムシリーズに属しています⁸⁻¹²。オリゴヌクレオチドには、従来の UPLC/HPLC カラムに通常使用されている金属表面（ステンレス製ケーシングやフリットなど）と相互作用することが知られている負電荷を持つリン酸骨格が含まれています。このような相互作用は多くの場合、オリゴヌクレオチドの損失、クロマトグラフィーピークの形状不良、またはデータの再現性低下の原因になります。通常、新たに取り付けたカラムには、カラムを不動態化し、分析種と流路の金属表面の間の望ましくない相互作用を低減するために、高濃度のオリゴヌクレオチドサンプル（オンカラムで 20 ピコモル超）の連続注入が必要です。

図 2A に示す例において、通常の新しい ACQUITY BEH Amide カラムを使用する場合、OST 混合液に含まれる 5 種の主要オリゴヌクレオチドの UV レスポンスを安定化するには、最高 6 回の注入が必要でした。明らかに、最初の注入では、サンプルのロード量が多い場合（オンカラムで 20 ピコモルの OST を注入）でも、保持が非常に悪く、かなりの分析種の損失が認められました。その後の注入では、分析種と金属表面の間の相互作用が分離に及ぼす影響が小さくなりました。ただし、カラムが十分に不動態化されたと考えられる後（例えば、オンカラムで 20 ピコモルの OST を 6 回連続注入した後）でも、より大きいオリゴヌクレオチド（dT25、dT30、dT35）の回収率は依然として不良でした。対照的に、図 2B に示す ACQUITY Premier BEH Amide カラムで実施した最初の一連の注入においては、5 種の主要オリゴヌクレオチドすべてが一貫した UV レスポンスを示しています。更に、ACQUITY Premier BEH Amide カラムでは、dT3 から dT24 までの 20 種類の低濃度オリゴヌクレオチド不純物（失敗した配列）を再現性よく分離することができました。これらのクロマトグラムの再現性によって示される UV レスポンスの安定性からは、分離を達成するのにカラムの不動態化が不要であることが示されています。MaxPeak HPS 層は、金属表面と、これらの表面とキレート化しやすいオリゴヌクレオチドとの間で、バリアのような役割を果たし、これにより望ましくない相互作用が大幅に低減します。今回示したように、ACQUITY Premier BEH Amide カラムでは、カラムのコンディショニングなしで最初の注入から優れたオリゴヌクレオチド分離を達成できます。

2A



2B

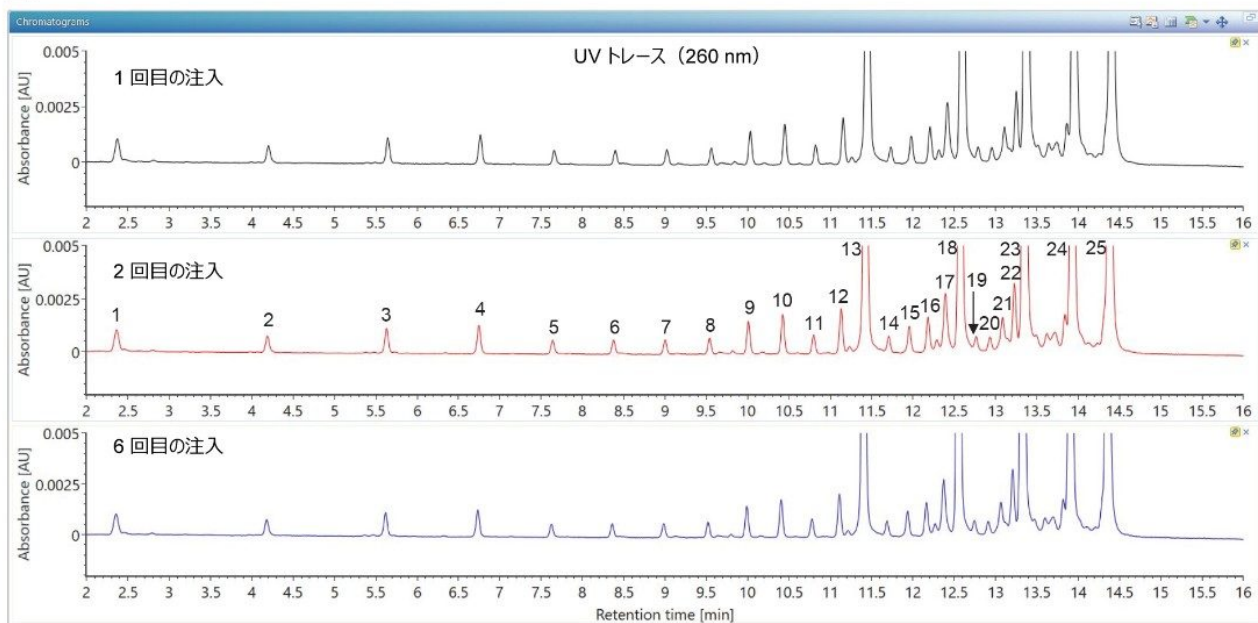
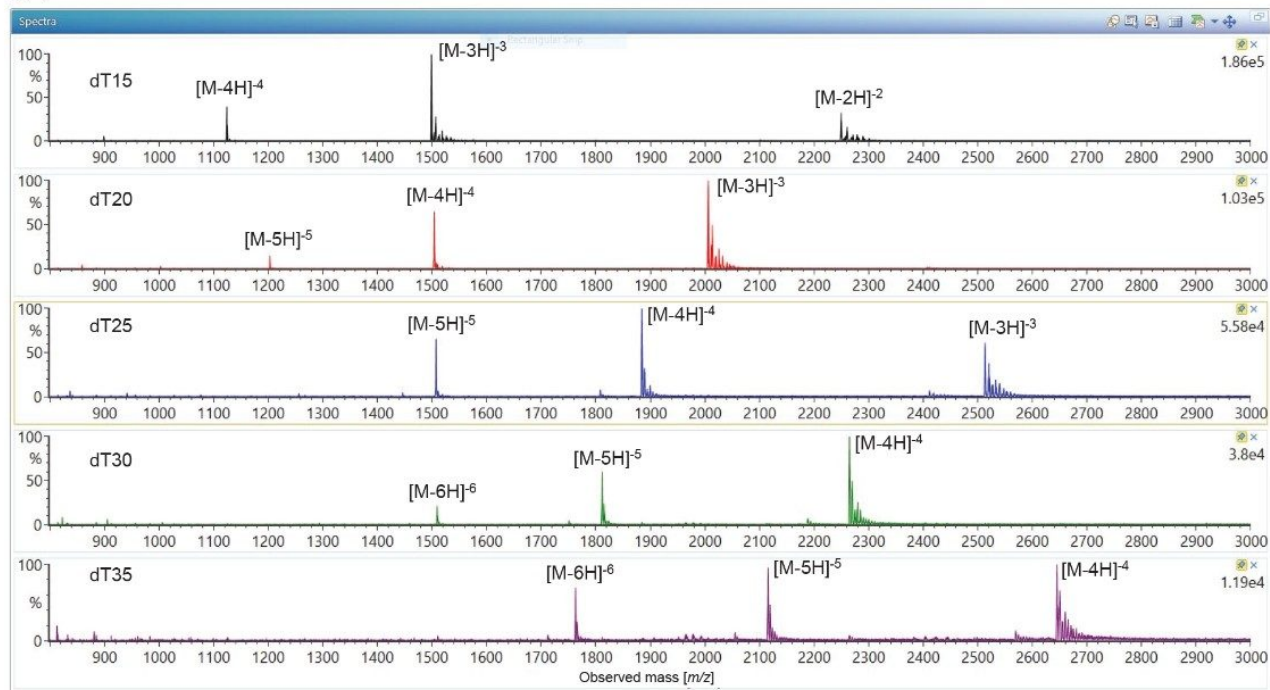


図 2. 2.1 × 50 mm カラム： (A) 従来のステンレス製 ACQUITY UPLC BEH Amide カラム（製品番号： [1860004800](#) ）、 (B) ACQUITY Premier BEH Amide カラム（製品番号： [186009504](#) ）で実施した OST 混合物の最初の一連の注

入を示す TUV クロマトグラム。従来のカラムでは安定した UV シグナルが得られるまでに徹底したコンディショニングが必要でしたが、ACQUITY Premier カラムではコンディショニングが全く不要です。ACQUITY Premier カラムでは低濃度不純物についても、カラムのコンディショニング/不動態化を必要とせずに再現性のあるクロマトグラフィー分離を得ることができます。図 2B で分離されたオリゴヌクレオチドは、デオキシチミジン酸の以下の失敗配列に対応しており（ピークはそれぞれ、1-dT3、2-dT4、3-dT5、4-dT6、5-dT7、6-dT8、7-dT9、8-dT10、9-dT11、10-dT12、11-dT13、12-dT14、13-dT15（主要成分）、14-dT16、15-dT17、16-dT18、17-dT19、18-dT20（主要成分））、ピーク 19～22 は溶出順に dT21～24 に対応し、ピーク 23～25 は主要成分 dT25、dT30、および dT35 に対応します。

MassPREP OST 標準サンプルに含まれる 5 種の主要オリゴヌクレオチドについて記録された HILIC ESI-MS スペクトルを図 3A に示します。同じ化合物の IP-RP ESI-MS スペクトルは、さまざまなチャージ状態による二峰性の分布を示すのに対し³、HILIC ESI-MS スペクトルは電荷が大幅に少なく、各オリゴヌクレオチドに主に 3 種の存在量の多いチャージ状態が認められます。IP-RP クロマトグラフィー分離は、高 pH の移動相（pH 8～10）に溶解した正電荷を持つアルキルアミンが、負電荷を持つオリゴヌクレオチドのリン酸骨格と強いイオン対を形成することに依存しています。これらの非共有結合相互作用は、オリゴヌクレオチドの分離に有益かつ不可欠ですが（アルキルアミンはその後の RP カラムの C₁₈ 疎水性鎖と相互作用するため）、IP-RP クロマトグラフィーに記録された ESI-MS オリゴヌクレオチドスペクトルの二峰性の分布によって示されるオリゴヌクレオチド構造にも影響を及ぼす可能性があります³。IP-RP クロマトグラフィーでは、OST オリゴヌクレオチドが部分的に変性して 2 種類のチャージ状態の分布が生じます。このうち 1 つはネイティブの立体構造に対応する低チャージ状態（-3～-5）、もう 1 つはより高いチャージ状態（-7 および -15）を含む変性オリゴの立体構造に対応します。HILIC 分離の場合、イオン対試薬は不要で、オリゴヌクレオチドの保持は、移動相と固定相に部分的に固定化された水の多い層の間の分配メカニズムに基づいています¹³⁻¹⁴。図 3A に示した対応する ESI-MS スペクトルに反映されているように、HILIC 相互作用により、OST のネイティブ状態の立体構造が維持されていると考えられます。このスペクトルには限られた数のチャージ状態が含まれ（3 つのみ）、すべてが比較的高質量の範囲（ $m/z = 1000 \sim 3000$ ）で検出されます。これらの非常に単純化した ESI-MS スペクトル（IP-RP スペクトルで通常観測されるチャージ状態が 7～12 種存在するスペクトルと対照的）の BayesSpray デコンボリューションにより、図 3B の解析結果に示した非常に正確なインタクト質量測定が得られます。すべての主要な OST について得られた質量精度は、IP-RP 分離についても以前に確認されたように、15 ppm 未満でした³。図 3A に示す HILIC ESI-MS スペクトルには、顕著に高いレベルの Na 付加イオンおよび K 付加イオン（裸のオリゴヌクレオチドシグナルの MS レスポンスの 20～40%）が含まれており、移動相に存在するネイティブなオリゴヌクレオチドと微量金属の間の強い結合を示していると考えられます。結果として、HILIC LC-MS 分析は、変性 IP-RP LC-MS 分析ほど感度が高くありません。

3A



3B

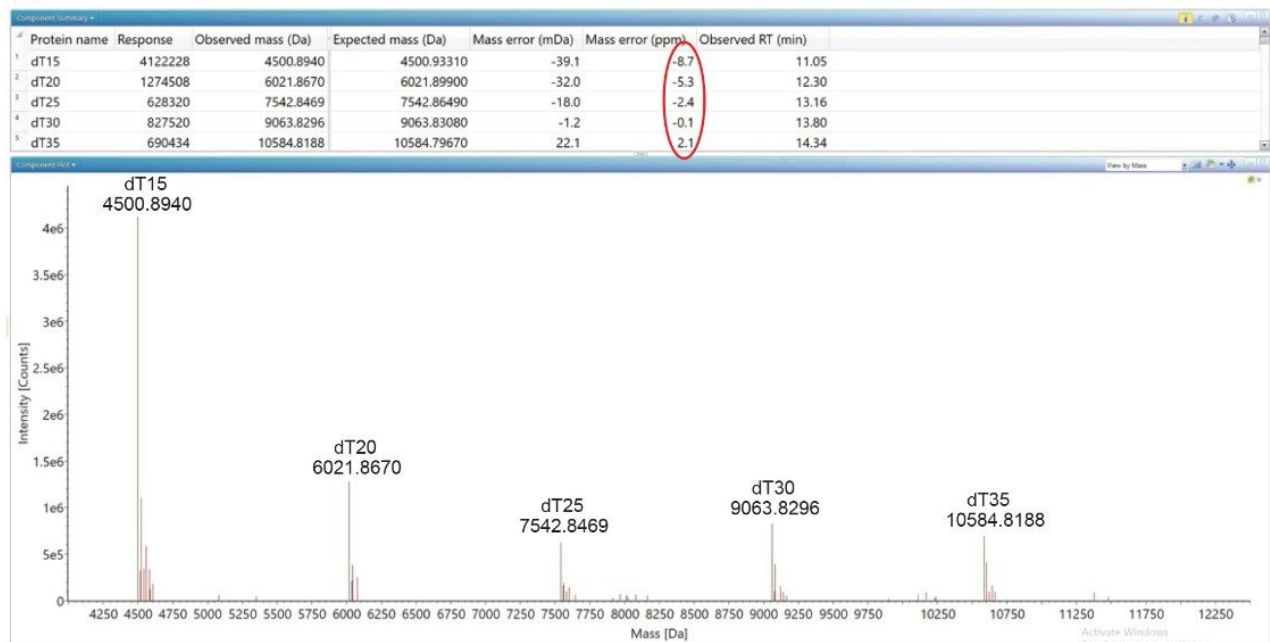
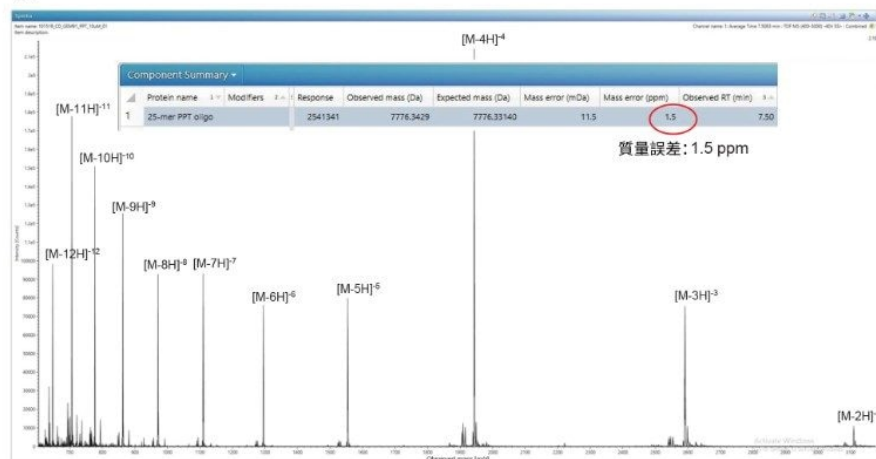


図 3. (A) OST 混合物の 5 成分について記録された *HILIC ESI-MS* スペクトル。すべてのオリゴヌクレオチドについて、存在量の多いチャージ状態が 3 種のみ検出され、すべての OST が気相でネイティブ状態の構造を採用していたこと

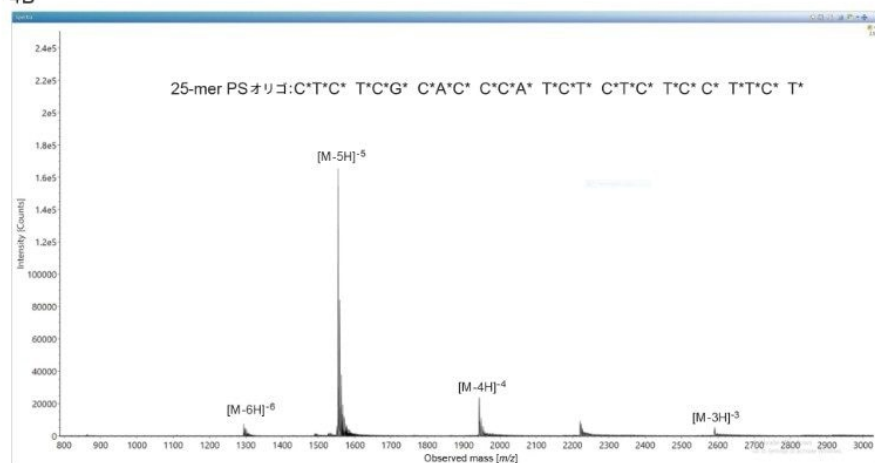
が示唆されます。(B) waters_connect ソフトウェアでの OST スペクトルの BayesSpray 解析後に得られたチャージデコンボリューションした OST スペクトル。5 つの化合物すべてについて得られた質量精度は 15 ppm 未満でした。

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) ^{15,16} の治療薬候補であった 25 mer の完全ホスホロチオエート化オリゴヌクレオチド (25 mer PS オリゴ) も、MassPREP OST 標準混合物と同じ実験条件を使用して HILIC LC-MS により分析しました。図 4B の対応する ESI-MS スペクトルでは、4 つのチャージ状態のみが見られ、ここでもネイティブ状態のオリゴヌクレオチド構造が示唆されます。この HILIC スペクトルは、図 4A の計 11 種のチャージ状態を含む同じ化合物の非常に「混んだ」IP-RP スペクトルとは大きく異なります (詳細については、参考文献 [3] を参照)。それにもかかわらず、waters_connect ソフトウェアによるデータ解析で得られた BayesSpray デコンボリューションしたスペクトルでは、図 4C のスクリーンショットに示すように、非常に良好な質量精度 (質量誤差 -4.0 ppm) が得られました。この質量精度を達成するためには、多くの硫黄原子を含むこの種類のオリゴヌクレオチド用に特別に設計された解析メソッドにおいて、ホスホロチオエート化 (PS) オリゴヌクレオチド同位体モデルを選択することが重要でした。

4A



4B



4C

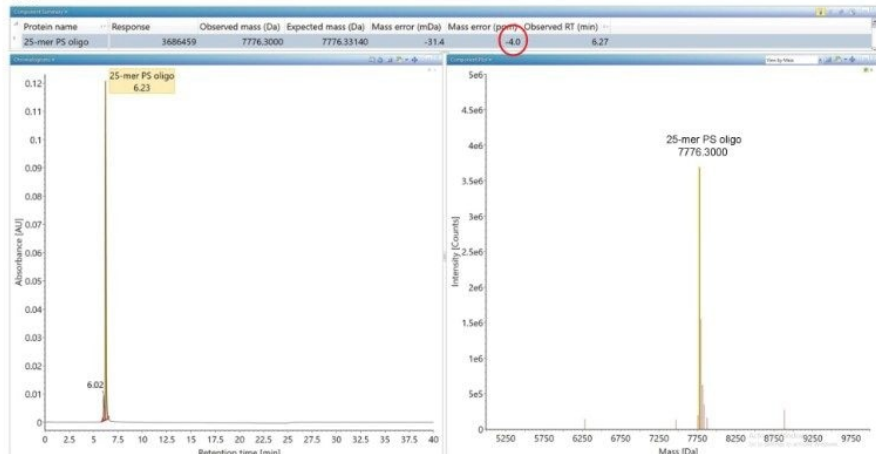


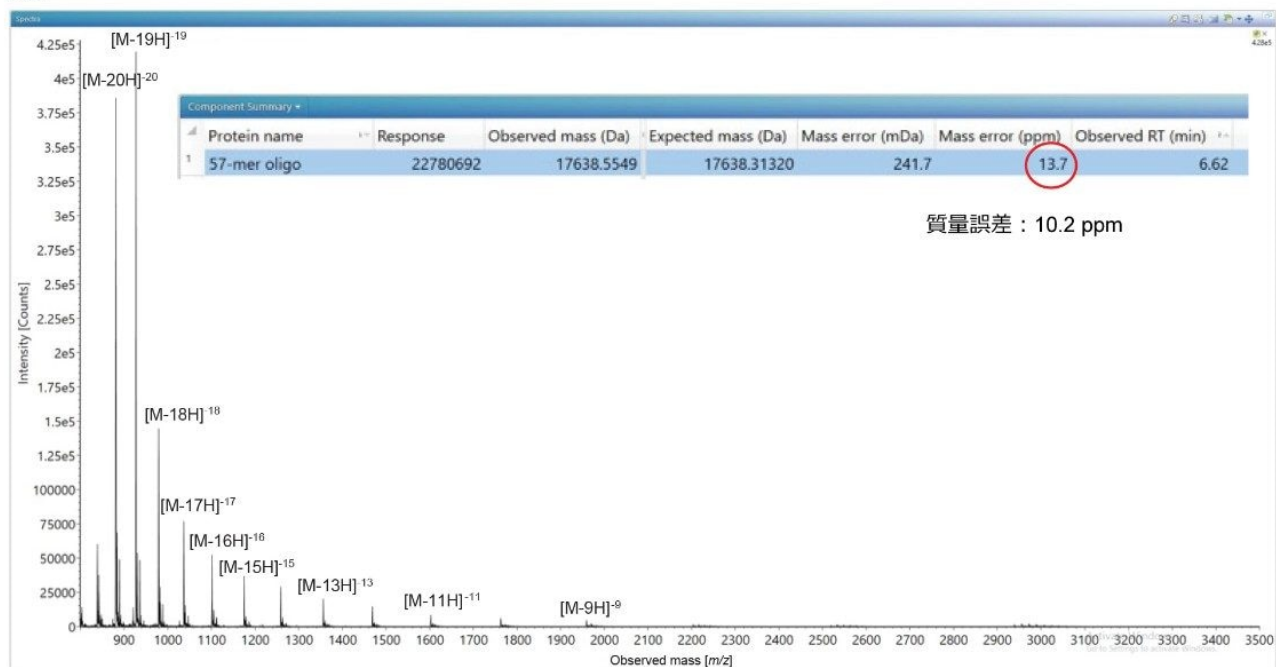
図 4. (A) 25 mer PS（完全ホスホロチオエート化）オリゴヌクレオチドの *IP-RP ESI-MS* スペクトル。この図の挿入図

には、*waters_connect* 解析メソッドのスクリーンショットが含まれており、チャージデコンボリューション後の測定質量が、予想質量からわずか 1.5 ppm しか外れていないことを示しています。(B) 同じオリゴヌクレオチドに対して記録された HILIC ESI-MS スペクトル。4 種のチャージ状態のみが検出され、このオリゴヌクレオチドがネイティブ状態の立体構造を有することが示されました。(C) HILIC ESI-MS スペクトルのチャージデコンボリューションの結果を示すスペクトル。

IP-RP スペクトルと HILIC ESI-MS スペクトルの間に見られたチャージ状態の差は、より大きなオリゴヌクレオチドでも維持されていました。57 mer のオリゴヌクレオチドは、IP-RP クロマトグラフィー (図 5A 参照) ではさまざまなチャージ状態 (13) を示したのに対し、HILIC クロマトグラフィーではわずか 3 種の完全に異なるチャージプロファイルしか示されませんでした (図 5B)。HILIC ESI-MS スペクトルでは、デコンボリューションに使用できるチャージ状態が少ない場合でも、*waters_connect* での BayesSpray 解析の後では同様の結果になり、質量誤差は 10.2 ppm でした (IP-RP ESI-MS スペクトルでは 13.7 ppm)。いずれの場合も、インタクト質量測定の質量精度は 15 ppm 未満でした。

最新のクロマトグラフィー分離により、IP-RP モードと HILIC モードで記録された ESI-MS スペクトルのチャージ状態の違いに加えて、オリゴヌクレオチドのインタクト質量確認における LC-MS 分析の運用コストにいくつかの利点もたらされます。IP-RP LC-MS の移動相の通常のコストは、同等量の移動相を調製する場合、HILIC の移動相の約 10 倍になります。これは主に、オリゴヌクレオチドの質量分析レスポンスを高めるために必要な、毒性の高い修飾剤である LC-MS グレード HFIP のコストがかさむためです。この修飾剤は、HILIC の移動相には必要ありません。このため、IP-RP 移動相に関連する毒性も回避できるため、この分離モードが更に魅力的になります。また、IP-RP で分析した場合のオリゴヌクレオチドの LC-MS シグナルは、移動相調製の約 24 時間後に低下し始めるので、少量の移動相 (1 日 200 ~ 500 mL) を頻繁に調製することが必要になります¹⁷。ただし、UV のオリゴヌクレオチドシグナルの安定性は影響を受けないため、光学検出のみを使用するアプリケーションでは、移動相を毎日調製する必要はありません。HILIC 分離におけるオリゴヌクレオチドの ESI-MS シグナルの安定性を調べるため、MS 検出器と UV 検出器の両方で記録された dT15 オリゴヌクレオチドのピーク面積を毎日モニターしました。2 つの大容量の (1 L) 移動相を調製して HILIC 移動相の溶離液 A および B とし、10 μ m OST サンプルの繰り返し注入 ($n = 3$) を 2 週間 (14 日間)、毎日行いました。ESI-MS シグナルは、OST 混合物に存在する dT15 オリゴヌクレオチドの三価のモノアイソトピック質量 ($m/z = 1498.57$ で $[M-3H]^{-3}$) について生成された抽出質量クロマトグラムのピーク面積によってモニターしました。この面積を、同じオリゴについて 260 nm で記録した UV クロマトグラムから得られたピーク面積と比較し、各注入での MS と UV のピーク面積の除算によって MS と UV の比を計算しました。このピーク面積比を図 6 にプロットしていますが、2 週間の期間全体にわたって非常に一定したレスポンスが示されています。このグラフは、この時間枠において HILIC 移動相が安定していることを明確に示しており、IP-RP 分析と比較した場合の HILIC LC-MS 分析の利点の 1 つであることを示しています (オリゴの IP-RP 分析では、移動相を頻繁に調製する必要がある)。

5A



5B

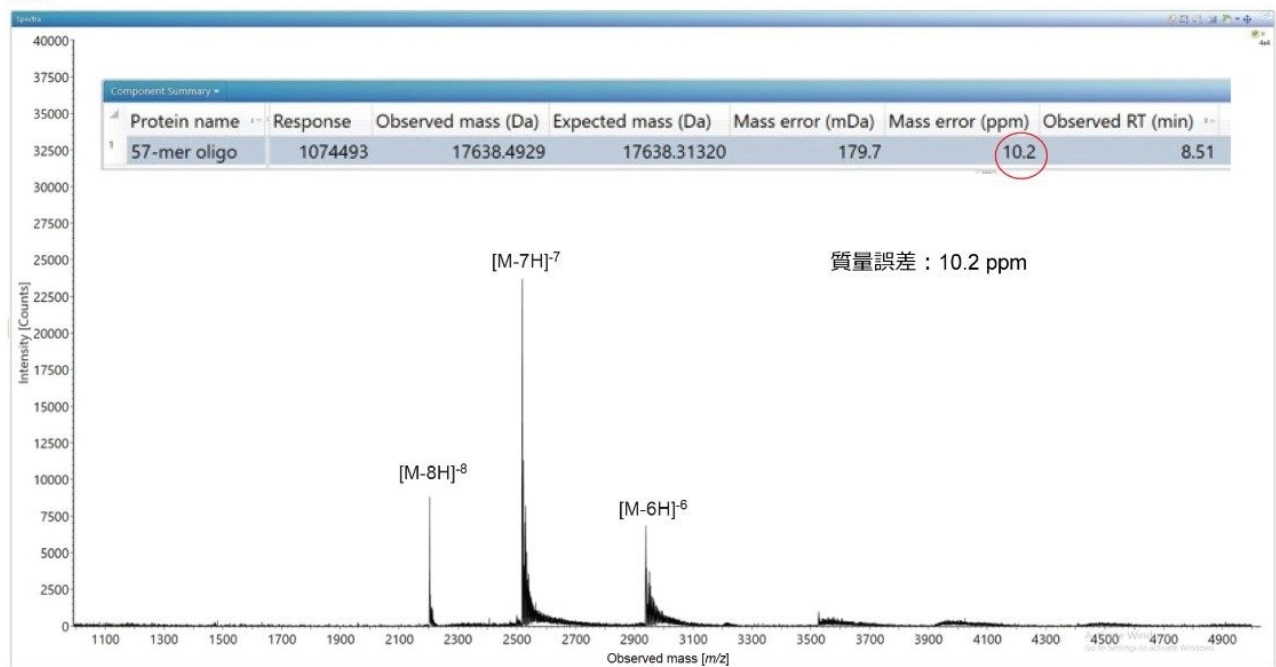


図 5. 57 mer のオリゴヌクレオチドの ESI-MS スペクトル: (A) チャージ状態の広い分布を示す IP-RP ESI-MS スペクトル。(B) IP-RP クロマトグラフィーでは検出されない 3 種の固有のチャージ状態のみを示す HILIC-ESI MS スペクトル。

ル。各パネルの挿入図は、*BayesSpray* チャージデコンボリューション後に得られた質量誤差を示しており、どちらの測定でも質量精度は 15 ppm 未満でした。

dT15 のピーク面積比
(MS/UV)

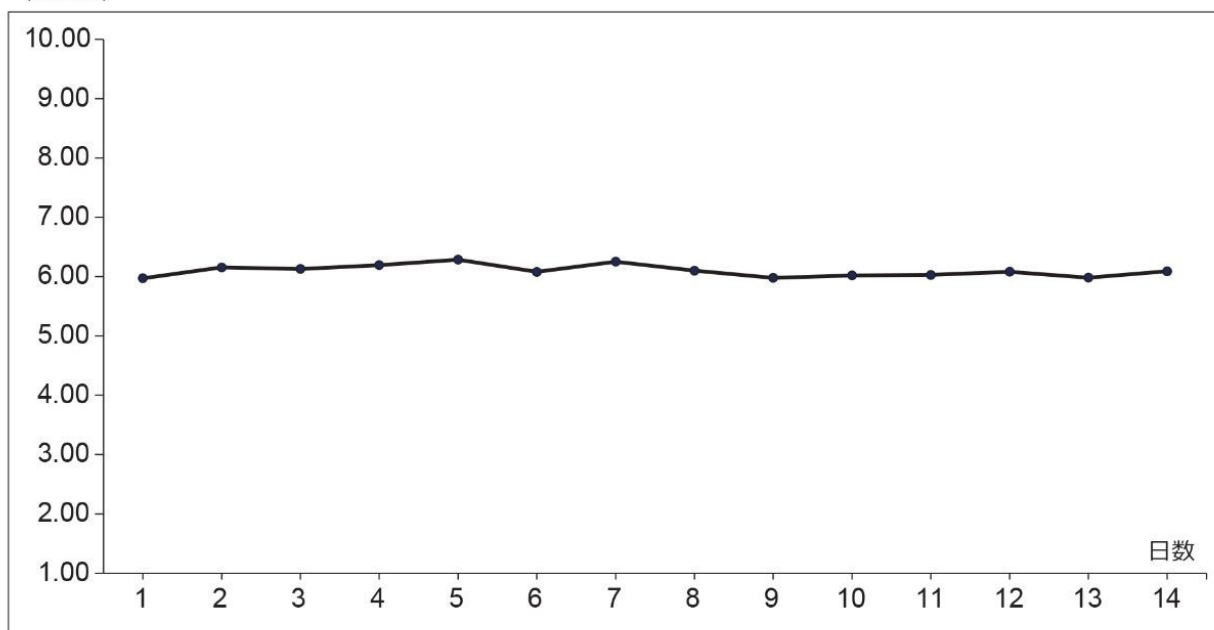


図 6. 2 週間にわたる実験の間の *HILIC* 移動相の安定性を示すトレンドプロット。*ESI-MS* と *UV* で記録された *dT15* オリゴヌクレオチドのレスポンスのピーク面積の比を毎日プロットしました。*MS* レスポンスでは、オリゴヌクレオチドの三価のプリカーサーイオン ($m/z = 1498.57$ で $[M-3H]^{-3}$) の抽出質量クロマトグラムを使用し、*UV* ピーク面積の測定には 260 nm の *TUV* レスポンスを使用しました。

結論

- *waters_connect* ワークフローでは、*HILIC LC-MS* で分析したオリゴヌクレオチドのインタクト質量確認において、良好な質量精度 (15 ppm 以上) が得られることが示されました。
- *MaxPeak High Performance Surfaces* を採用した *ACQUITY Premier BEH Amide* カラムにより、20 種類の低濃度不純物に対して、カラムの不動態化なしで高い感度と再現性が得られます。

- HILIC ベースの LC-MS 分析の主な利点は、移動相組成関連が中心となります。すなわち、HILIC 移動相は、IP-RP 移動相と比較して毒性が低く、低コストで、LC-MS シグナルがより長期間にわたって安定しています。
- 今回開発した HILIC LC-MS 分析法は、オリゴヌクレオチドのインタクト質量分析の実現可能な代替法と考えることができます。

参考文献

1. Vivek K Sharma, Jonathan K Watts. Oligonucleotide Therapeutics: Chemistry, Delivery and Clinical Progress, *Future Med Chem*, 2015, 7(16), 2221–2242.
 2. Roberts TK, Langer R, Wood MJA Advances in Oligonucleotide Drug Delivery, *Nat Reviews*, 2020, 19, 673–694.
 3. Catalin E. Doneanu, Jonathan Fox, Emma Harry, Chris Knowles, Ying Qing Yu, Joseph Fredette, Weibin Chen. An Automated Compliance-Ready LC-MS Workflow for Intact Mass Confirmation and Purity Analysis of Oligonucleotides, Waters Application Note, [720006820EN](#), 2020.
 4. Catalin E. Doneanu, Jonathan Fox, Emma Harry, Chris Knowles, Ying Qing Yu, Joseph Fredette, Weibin Chen. Intact Mass Confirmation Analysis on the BioAccord LC-MS System for a Variety of Extensively Modified Oligonucleotides, Waters Application Note, [720007028EN](#), 2020.
 5. Goyon A, Yehl P, Zhang K Characterization of Therapeutic Oligonucleotides by Liquid Chromatography, *J Pharm Biomed Analysis*, 2020, 182, 1–17.
 6. Sutton JM, Guimaraes GJ, Annavarapu V, van Dongen WD, Bartlett MG Current State of Oligonucleotide Characterization Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: Insight into Critical Issues, *JASMS*, 2020, 31, 1775–1882.
 7. Lobue PA, Jota M, Addepalli B, Limbach PA Oligonucleotide Analysis by Hydrophilic Interaction Chromatography-Mass spectrometry in The Absence of Ion-Pair Reagents, *J Chrom A*, 2019, 1595, 39–48.
 8. M. Lauber, T. H. Walter, M. Gilar, M. DeLano, C. Boissel, K. Smith, R. Birdsall, P. Rainville, J. Belanger, and K. Wyndham. Low adsorption HPLC Columns Based on MaxPeak High Performances Surfaces, Waters White Paper, [720006930EN](#) <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf>> , 2020.
 9. DeLano M, Walter TH, Lauber MA, Gilar M, Jung MC, Nguyen J, Boissel C, Patel AV, Bates-Harrison A,
-

- Wyndham K Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions With Metal Surfaces in UHPLC, *Anal Chem*, 2021, 93, 5773–5781.
10. Gilar M, DeLano M, Gritti F Mitigation of Analyte Interactions With Metal Surfaces in UHPLC, *J Chrom A* 2021, 1650, 462247.
11. Kathryn Brennan, Mary Trudeau, Paul D. Rainville Utilization of the ACQUITY Premier System and Column for Improved Oligonucleotide Bioanalytical Chromatographic Performance, Waters application Note, [720007119EN](#), 2021.
12. Brooke M. Koshel, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu. Improving Recovery and Quantitation of Oligonucleotide Impurities Using the ACQUITY Premier with MaxPeak HPS Technology, Waters application Note, [720007238EN](#), 2021.
13. Alpert AJ Hydrophilic-Interaction Chromatography for the Separation of Peptides, Nucleic Acids and Other Polar Compounds, *J Chrom* 1990, 499, 176–196.
14. Hemstrom P, Irgum K, Hydrophilic Interaction Chromatography, *J Sep Sci* 1990, 499, 176–196.
15. Gilar M, Belenky A, Smisek DL, Bourque A, Cohen AS Kinetics of Phosphorothioate Oligonucleotide Metabolism in Biological Fluids, *Nucleic Acids Res*, 1997, 25, 3615–3620.
16. Zhang R, Diasio RB, Lu Z, Liu T, Jiang Z, Galbraith WM, Agrawal S Pharmacokinetics and Tissue Distribution in Rats of an Oligodeoxynucleotide (GEM 91) Developed as a Therapeutic Agent for Human Immunodeficiency Virus TYPE-1, *Biochem Pharmacol*, 1995, 49, 929–939.
17. Birdsall R, Gilar M, Shion H, Yu YQ, Chen W Reduction of Metal Adducts in Oligonucleotide Mass Spectra in Ion-Pair Reversed-Phase Chromatography/Mass Spectrometry, *Rapid Comm Mass Spectrom*, 2016, 14, 1667–1679.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

バイオ医薬品のための BioAccord LC-MS システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

UNIFI 科学情報システム <<https://www.waters.com/134801648>>

[waters_connect <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165)

720007395JA、2021 年 12 月 改訂

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー](#)
[環境設定](#)